

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-164724

(43)公開日 平成5年(1993)6月29日

(51)IntCl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

G01N 27/327

27/28

27/27

331 Z 7235-2J

7235-2J

7235-2J

G01N 27/30

353 J

353 R

審査請求 未請求 請求項の数4(全6頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平3-328657

(22)出願日

平成3年(1991)12月12日

(71)出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72)発明者 上野山 晴三

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72)発明者 奥田 久

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

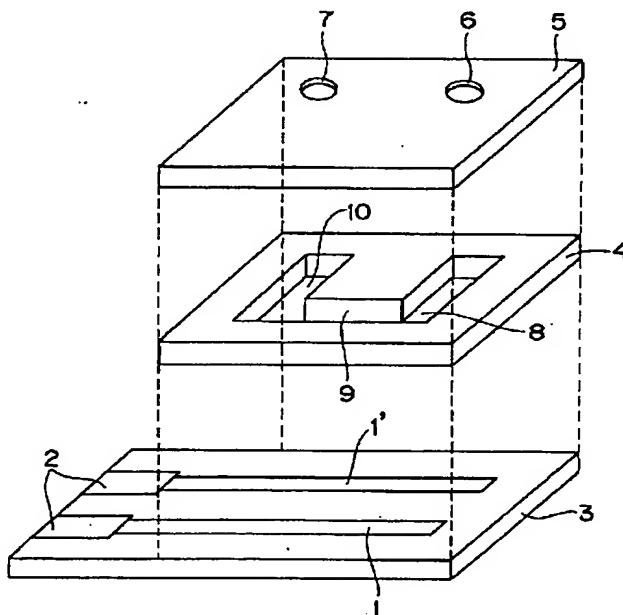
(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54)【発明の名称】 バイオセンサーおよびそれを用いた分離定量方法

(57)【要約】

【構成】 液体試料中の目的物質とそれと特異的に反応する少なくとも1種の物質とを反応させ、生成した電気化学的活性物質を電気化学的に検出するバイオセンサーにおいて、作用電極が少なくとも2つの電極部分から成り、供給された液体試料が順次それぞれの作用電極に一定の時間間隔をおいて接触するバイオセンサー。

【効果】 目的物質に由来して発生する電流と、妨害物質に由来する電流とを分離して測定できるので、液体試料中の目的物質の濃度を、妨害物質に影響されことなく定量できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 液体試料中の目的物質とそれと特異的に反応する少なくとも1種の物質とを反応させ、生成した電気化学的活性物質を電気化学的に検出するバイオセンサーにおいて、作用電極が少なくとも2つの電極部分から成り、供給された液体試料が順次それぞれの作用電極部分に一定の時間間隔をおいて接触することを特徴とするバイオセンサー。

【請求項2】 目的物質と特異的に反応する物質が、作用電極部分の1つのみに配置された請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項3】 作用電極部分の少なくとも1つにメディエーターが配置された請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項4】 液体試料中の目的物質とそれと特異的に反応する少なくとも1種の物質とを反応させ、生成した電気化学的活性物質を電気化学的に検出するバイオセンサーであって、作用電極が少なくとも2つの電極部分から成り、供給された液体試料が順次それぞれの作用電極部分に一定の時間間隔をおいて接触するバイオセンサーに試料を供給し、試料が最初に接触する作用電極部分において1回目の測定を行って電気化学的活性物質のみに依存する電気的信号を取り込み、続いて一定の時間間隔をおいて試料が他の作用電極部分に接触した後、十分な時間経過後2回目の測定を行って目的物質および電気化学的に活性な物質の両方に依存する電気的信号を取り込み、両信号を演算することにより、試料中の目的物質および電気化学的活性物質とを分離定量することを特徴とする液体試料中の物質の分離定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、バイオセンサーおよびそれを用いた分離定量方法に関し、更に詳しくは、血液、血清、尿、唾液などの液体試料中の特定物質を検出定量する為のバイオセンサーおよび分離定量方法に関する。定量する目的物質としては、グルコース、乳酸、コレステロール、アルコール、尿素などが例示できるが、これらに限定されるものではない。また、これらと特異的に反応する物質としては各種の酸化還元酵素などが挙げられる。目的物質以外の電気化学的物質としてはアスコルビン酸、尿酸などが代表的である。

【0002】

【従来の技術】液体試料中の特定物質としては上記のような種々の物質があるが、一例として乳酸とアスコルビン酸の分離定量を採りあげて従来の技術を説明する。乳酸は、乳酸オキシダーゼと反応することにより電気化学的に活性な物質を生成する。その時に流れる電流値を測定することにより試料中の乳酸濃度を測定することができる。しかし、試料中にはアスコルビン酸などの電気化学的に活性な物質も含まれており、これが正確な濃度測定を妨げる原因ともなっている。

【0003】この問題点を解決するため、本出願人は、先に特願平3-113030号(平成3年5月17日出願)を出願し、その中で作用電極と対極とからなるバイオセンサーにおいて、たとえば酵素を電極表面から空間的に離れた部位に配置し、目的物質とアスコルビン酸とを分離測定する方法を提案した。酵素を電極から離れた部位に配置しているため、試料供給後当初はアスコルビン酸のみに依存する信号が測定でき、続いて酵素反応による反応生成物質が拡散によって電極表面に到達しアスコルビン酸と乳酸の両方に依存する信号を測定し両信号を演算することにより分離測定ができる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、この先願の方法では両信号の分離を反応物質の拡散に依存しているため、たとえば試料として血液を用いると、血球が拡散に大きく影響し、その結果ヘマトクリットが感度に影響を及ぼすといった問題が残っている。検体として、尿、唾液などを用いる場合は問題はないが、赤血球など粒子状成分の多い血液を用いる場合は、血清を分離して測定する必要があることが判明した。

【0005】

【課題を解決する為の手段】上記課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、酵素を電極から離すことなく配置し、かつ分離定量できるバイオセンサーを完成するに至った。すなわち、本発明は、上記課題を、液体試料中の目的物質とそれと特異的に反応する少なくとも1種の物質とを反応させ、生成した電気化学的活性物質を電気化学的に検出するバイオセンサーにおいて、作用電極が少なくとも2つの電極部分から成り、供給された液体試料が順次それぞれの作用電極部分に一定の時間間隔をおいて接触することを特徴とするバイオセンサーにより解決する。

【0006】更に、本発明は、上記本発明のバイオセンサーに試料を供給し、試料が最初に接触する作用電極部分において1回目の測定を行って電気化学的活性物質のみに依存する電気的信号を取り込み、続いて一定の時間間隔をおいて試料が他の作用電極部分に接触した後、十分な時間経過後2回目の測定を行って目的物質および電気化学的に活性な物質の両方に依存する電気的信号を取り込み、両信号を演算することにより、試料中の目的物質および電気化学的活性物質とを分離定量することを特徴とする液体試料中の物質の分離定量方法をも提供するものである。

【0007】本発明の特徴は、作用電極が少なくとも2つの電極部分から成っており、その少なくとも1つに酵素が配置され、他の電極部分には酵素は配置されないことである。さらに、本発明のバイオセンサーは、妨害物質であるアスコルビン酸などを、試料が酵素を配置した電極部分に達していない内に測定するために、複数の電極を結ぶ試料の流路をバイオセンサーに設けて、まず酵

素が配置されていない電極部分に試料が供給され、続いて自動的に一定の時間間隔において酵素が配置された電極部分にも試料が供給されるように構成されている。

【0008】本明細書において、「電気化学的活性物質」とは、物質自身が作用電極と直接電子の授受をできるもの以外に、バイオセンサーに配置されたメディエーターなどと反応した結果、間接的に作用電極と電子の授受をできるようになる物質も含む。

【0009】

【実施例】本発明のバイオセンサーの一例の分解斜視図を図1に示す。このバイオセンサーは、以下のようにして製造することができる。なお、この例は、乳酸定量用のバイオセンサーであるが、定量目的物質に応じて、適宜設計変更し得ることは、言うまでもない。

【0010】ポリエチレンテレフタレート製シート状基板3上に、シルク印刷などにより銀リード線2付き炭素電極1および1'を形成する。その上に、被検液を収容する空間8~10を有するポリエチレンテレフタレート(PET)製スペーサー4を両面接着テープにより基板3に貼り付ける。次に、空間8~10全体を満たすように、30mMフェリシアン化カリウムおよび1%ヒドロキシプロピルセルロースの水溶液30 μ lを滴下し、乾燥することによりフェリシアン化カリウムを固相として配置する。更に、空間10の作用電極1'上に、320mMフェリシアン化カリウム、1%ヒドロキシプロピルセルロースおよび20mg/dl乳酸オキシダーゼの水溶液3 μ lを滴下し、乾燥することにより、酵素およびフェリシアン化カリウムを固相として配置する。最後に、試料吸入口6と試料排出口7を有するPET製カバー5を両面接着テープによりスペーサー4に貼り付けることにより乳酸センサーを完成する。

【0011】実施例

上記のようにして製造したバイオセンサーを用い、測定用試料として血液を用いて、乳酸を定量した。血液試料を試料吸入口6より吸入させ、直ちに第1の電圧+200mVを5秒間印加し、5秒後の電流値を測定した。この第1測定電流を図2に示す。

【0012】第1電流測定時には空間8のみを満たしていた血液は、一定の時間間隔において通路9を通り空間10に達した。この時はじめて空間10の電極上に配置した酵素が血液中の乳酸と反応した。試料吸入後115秒後から第2の電圧+200mVを5秒間印加し、その5秒後の電流値を測定した。この第2測定電流を図3に示す。

【0013】図2は、第1測定電流を縦軸に、アスコルビン酸濃度を横軸にとったアスコルビン酸に対する検量線である。この検量線は、乳酸濃度の幅広い変化にもかかわらず1本の直線で近似できる。すなわち、アスコルビン酸が乳酸から分離定量できたことを示している。

【0014】図3は、第2測定電流を縦軸に、乳酸濃度を横軸にとった乳酸に対する検量線である。この検量線はアスコルビン酸の各濃度に対し、それに依存した応答電流分だけ縦軸正方向に移動している。これは、乳酸測定に対しアスコルビン酸が正の妨害を与えることを示している。

【0015】図3の検量線を図2の検量線を使って補正した結果を図4に示す。全ての補正值は、アスコルビン酸の幅広い変化にもかかわらず1本の直線上にのった。すなわち、乳酸はアスコルビン酸から分離定量できたことを意味する。

【0016】次に、血球と血漿とを一定の割合で混合して調製した血液試料に、乳酸を100mg/dlの濃度となるように添加し、上記センサーを用いて電流値を測定した。図5に第2測定電流を示す。一方、比較例として、特願平3-113030号に記載の乳酸センサーを用いて同じ血液試料についての第2測定電流を測定した。結果を図5に示す。

【0017】比較例ではヘマトクリット(Ht)が高くなると測定電流が低下し、Ht40%以上で急激に感度が低下する。しかし、本発明のセンサーでは、Ht20~50%までほとんど感度が低下していない。従って、本発明のセンサーによれば、全血でもHtの影響を受けることなく乳酸を分離定量できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の2電極分離定量用バイオセンサーの1例の分解斜視図。

【図2】 第1測定電流のアスコルビン酸に対する検量線。

【図3】 第2測定電流の乳酸に対する検量線。

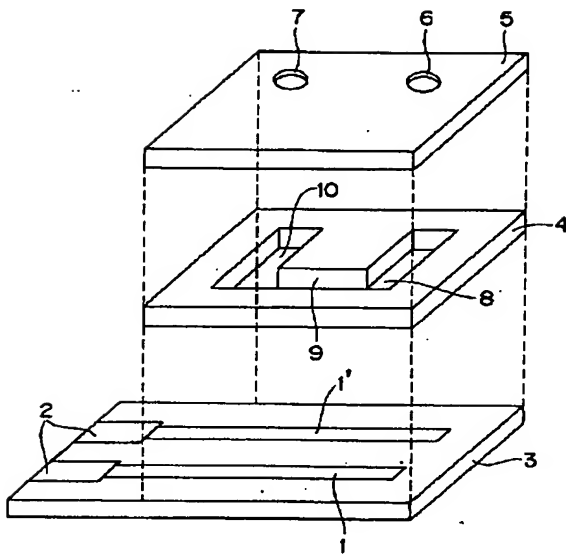
【図4】 図3の検量線を図2の検量線を使って補正した検量線。

【図5】 本発明の乳酸センサーのヘマトクリットの影響を従来法と比較して示したグラフ。

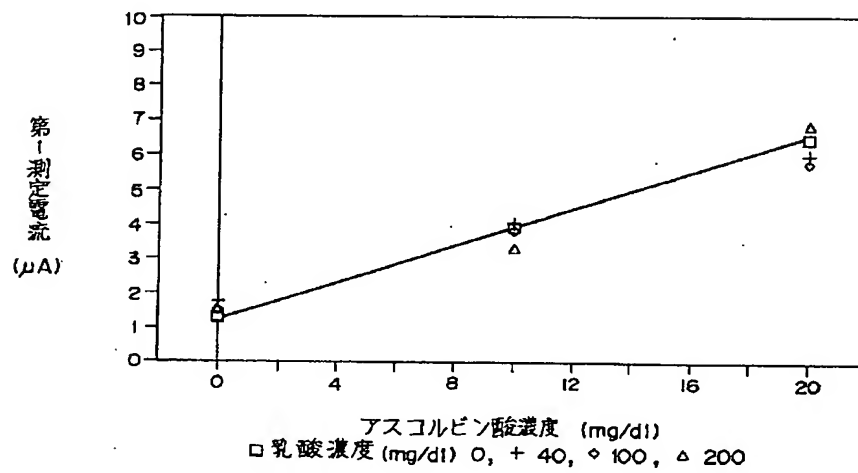
【符号の説明】

1, 1': 炭素電極、2: シード線、3: 基板、4: スペーサー、5: カバー、6: 試料吸入口、7: 試料排出口、8, 10: 空間、9: 回路部。

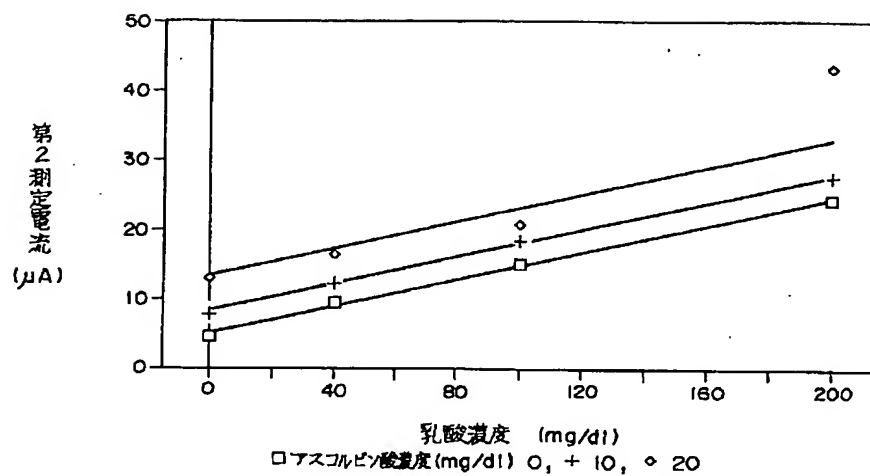
【図1】



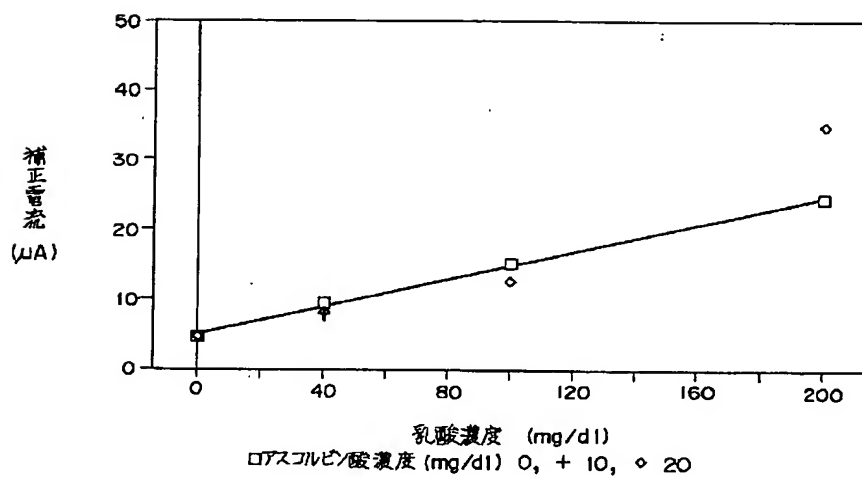
【図2】



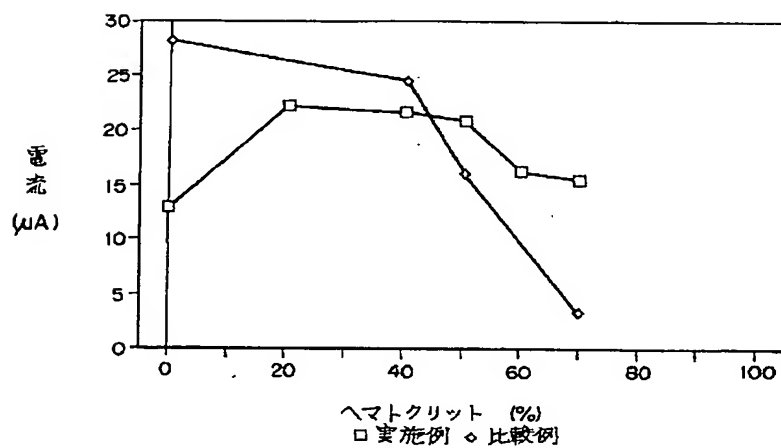
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

G O 1 N 27/416

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

6923-2 J

G O 1 N 27/46

B

6923-2 J

3 3 6 B